

Docket No. 206018US0

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

J10002 U.S. PTO
09/035381
04/17/01


IN RE APPLICATION OF: Mikiko SUGA, et al.

GAU:

SERIAL NO: NEW APPLICATION

EXAMINER:

FILED: HEREWITH

FOR: ARGININE REPRESSOR DEFICIENT STRAIN OF CORYNEFORM BACTERIUM AND METHOD FOR
PRODUCING L-ARGININE

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

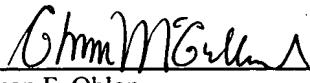
<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
JAPAN	2000-129167	April 28, 2000

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- is submitted herewith
- will be submitted prior to payment of the Final Fee
- were filed in prior application Serial No. filed
- were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
- (B) Application Serial No.(s)
 - are submitted herewith
 - will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Registration No. 24,618

C. Irvin McClelland
Registration Number 21,124



22850
Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 10/98)

J1002 U.S. PRO
09/825381
04/17/01



日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2000年 4月28日

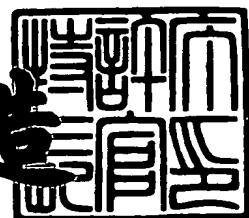
出願番号
Application Number: 特願2000-129167

出願人
Applicant(s): 味の素株式会社

2001年 3月16日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3020682

【書類名】 特許願
【整理番号】 P-7232
【提出日】 平成12年 4月28日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12P 13/10
C12N 15/00
【発明の名称】 コリネ型細菌のアルギニンリプレッサー欠失株及びL-アルギニンの製造法
【請求項の数】 4
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社発酵
技術研究所内
【氏名】 菅 美喜子
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社発酵
技術研究所内
【氏名】 朝倉 陽子
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社発酵
技術研究所内
【氏名】 森 由起子
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社発酵
技術研究所内
【氏名】 伊藤 久生
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社発酵
技術研究所内
【氏名】 倉橋 修

【特許出願人】

【識別番号】 000000066

【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089244

【弁理士】

【氏名又は名称】 遠山 勉

【選任した代理人】

【識別番号】 100090516

【弁理士】

【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100100549

【弁理士】

【氏名又は名称】 川口 嘉之

【連絡先】 03-3669-6571

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 012092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 コリネ型細菌のアルギニンリプレッサー欠失株及びL-アルギニンの製造法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アルギニンリプレッサーが正常に機能せず、かつ、L-アルギニン生産能を有するコリネ型細菌。

【請求項2】 前記コリネ型細菌は、染色体上のアルギニンリプレッサーをコードする遺伝子が破壊されたことにより、アルギニンリプレッサーが正常に機能しないことを特徴とする請求項1記載のコリネ型細菌。

【請求項3】 前記アルギニンリプレッサーは、配列番号18に示すアミノ酸配列又は同アミノ酸配列と相同性を有するアミノ酸配列を有する請求項2記載のコリネ型細菌。

【請求項4】 請求項1～3のいずれか一項に記載のコリネ型細菌を培地で培養し、培地中にL-アルギニンを生成蓄積せしめ、これを該培地から採取することを特徴とするL-アルギニンの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、L-アルギニン生産能を有するコリネ型細菌及び同微生物を用いたL-アルギニンの製造法に関する。L-アルギニンは、肝機能促進薬、アミノ酸輸液及び総合アミノ酸製剤等の成分として、産業上有用なアミノ酸である。

【0002】

【従来の技術】

従来、発酵法によるL-アルギニンの製造は、コリネ型細菌野生株；サルファ剤、2-チアゾールアラニン又は α -アミノ- β -ヒドロキシ吉草酸等の薬剤に耐性を有するコリネ型細菌；2-チアゾールアラニン耐性に加えて、L-ヒスチジン、L-プロリン、L-スレオニン、L-イソロイシン、L-メチオニンまたはL-トリプトファン要求性を有するコリネ型細菌（特開昭54-44096号）；ケトマロン酸、フルオロマロン酸又はモノフルオロ酢酸に耐性を有するコリ

ネ型細菌（特開昭57-18989号）；アルギニノールに耐性を有するコリネ型細菌（特開昭62-24075号）；または、X-ゲアニジン（Xは脂肪酸又は脂肪鎖の誘導体）に耐性を有するコリネ型細菌（特開平2-186995号）等を用いて行われている。

【0003】

一方、組換えDNA技術によりL-アルギニンの生合成酵素を増強することによって、L-アルギニンの生産能を増加させる種々の技術が開示されている。例えば、エシェリヒア属に属する微生物由来のアセチルオルニチンデアセチラーゼ、N-アセチルグルタミン酸-γ-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、N-アセチルグルタモキナーゼ、及びアルギニノサクシナーゼの遺伝子を含むDNA断片とベクターDNAとの組換え体DNAを保有せしめたコリネバクテリウム属又はブレビバクテリウム属に属する微生物（特公平5-23750号）を用いてL-アルギニンを製造する方法等が開示されている。

【0004】

また、コリネ型細菌では、いくつかのL-アルギニン生合成系酵素の生成が、L-アルギニンにより抑制されていることが調べられている。さらに、L-アルギニン生合成系酵素のいくつかは、L-アルギニンによる抑制を受けるが、L-アルギニン蓄積量が向上したコリネ型細菌の変異株では、これらの酵素のL-アルギニンによる抑制が解除されていることが報告されている（Agric. Biol. Chem., 43(1), 105, 1979）。

【0005】

一方、エシェリヒア・コリでは、L-アルギニン生合成系のリプレッサー及びリプレッサーをコードする遺伝子が特定されており（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1987), 84(19), 6697-701）、またリプレッサータンパクと各種L-アルギニン生合成系遺伝子との結合相互作用についても調べられている（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1987), 84(19), 6697-701, J. Mol. Biol. (1992), 226, 367-386）。

【0006】

しかしながら、コリネ型細菌では、L-アルギニン生合成系のリプレッサータ

ンパクは同定されていない。リプレッサータンパク遺伝子（argR）については、遺伝子データベースGenBankに、その塩基配列とそれによってコードされると想定されるアミノ酸配列が登録されているが（AF049897）、これは前記アミノ酸配列と公知のアルギニンリプレッサーとの相同性からargRと命名されたものと考えられる。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

前述のように、コリネ型細菌のL-アルギニン生合成系のリプレッサータンパク及びその遺伝子が推定されているが、リプレッサータンパク自体特定されておらず、機能等についても全く明らかにされていない。本発明は、コリネ型細菌のL-アルギニン生合成のリプレッサーを特定し、コリネ型細菌のL-アルギニン生産能を向上させることを課題とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、遺伝子データベース中にargRとして登録されている遺伝子（GenBank accession AF049897）のホモログをコリネ型細菌から単離し、同遺伝子をコリネ型細菌で増幅するとL-アルギニン生産能が低下し、一方、同遺伝子を破壊するとL-アルギニン生産能が向上することを見出し、コリネ型細菌もエシェリヒア・コリと同様にL-アルギニン生合成がリプレッサーによって抑制されていること、及び前記のargRとして登録されている遺伝子が、当該リプレッサーをコードしていることを確認し、本発明を完成する至った。

すなわち本発明は、以下のとおりである。

【0009】

(1) アルギニンリプレッサーが正常に機能せず、かつ、L-アルギニン生産能を有するコリネ型細菌。

(2) 前記コリネ型細菌は、染色体上のアルギニンリプレッサーをコードする遺伝子が破壊されたことにより、アルギニンリプレッサーが正常に機能しないことを特徴とする(1)のコリネ型細菌。

(3) 前記アルギニンリプレッサーは、配列番号18に示すアミノ酸配列又は同

アミノ酸配列と相同性を有するアミノ酸配列を有する（2）のコリネ型細菌。

（4）（1）～（3）のいずれかのコリネ型細菌を培地で培養し、培地中にL-アルギニンを生成蓄積せしめ、これを該培地から採取することを特徴とするL-アルギニンの製造法。

【0010】

本発明において「アルギニンリプレッサー」とは、L-アルギニン生合成を抑制する作用を有するタンパク質であり、コリネ型細菌において同タンパク質をコードする遺伝子の発現量が増加するとL-アルギニン生産能が低下し、発現量が低下又は消失するとL-アルギニン生産能が向上する。以下、アルギニンリプレッサーをコードする遺伝子をargR遺伝子ともいう。また、本発明においてL-アルギニン生産能」とは、本発明の微生物を培地に培養したときに、培地中にL-アルギニンを蓄積する能力をいう。

【0011】

【発明の実施の形態】

本発明の微生物は、アルギニンリプレッサーが正常に機能せず、L-アルギニン生産能を有するコリネ型細菌である。本発明のコリネ型細菌は、アルギニンリプレッサーが正常に機能しないことによりL-アルギニン生産能を有するものであってもよいし、L-アルギニン生産能を有するコリネ型細菌をアルギニンリプレッサーが正常に機能しないように育種したものであってもよい。また、コリネ型細菌をアルギニンリプレッサーが正常に機能しないように育種した後に、L-アルギニン生産能を付与したものであってもよい。

【0012】

コリネ型細菌は、従来ブレビバクテリウム属に分類されていたが現在コリネバクテリウム属に統合された細菌を含み（Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1981)）、またコリネバクテリウム属と非常に近縁なブレビバクテリウム属細菌を含む。このようなコリネ型細菌の例として以下のものが挙げられる。

【0013】

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム

コリネバクテリウム・アルカノリティカム
コリネバクテリウム・カルナエ
コリネバクテリウム・グルタミカム
コリネバクテリウム・リリウム（コリネバクテリウム・グルタミカム）
コリネバクテリウム・メラセコーラ
コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス
コリネバクテリウム・ハーキュリス
ブレビバクテリウム・ディバリカタム（コリネバクテリウム・グルタミカム）
ブレビバクテリウム・フラバム（コリネバクテリウム・グルタミカム）
ブレビバクテリウム・インマリオフィラム
ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム（コリネバクテリウム・グルタミカム）
ブレビバクテリウム・ロゼウム
ブレビバクテリウム・サッカロリティカム
ブレビバクテリウム・チオゲニタリス
ブレビバクテリウム・アルバム
ブレビバクテリウム・セリヌム
ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム

【0014】

L-アルギニン生産能を有するコリネ型細菌としては、L-アルギニン生産能を有するものであれば特に制限されないが、例えば、コリネ型細菌野生株；サルファ剤、2-チアゾールアラニン又は α -アミノ- β -ヒドロキシ吉草酸等の薬剤に耐性を有するコリネ型細菌；2-チアゾールアラニン耐性に加えて、L-ヒスチジン、L-プロリン、L-スレオニン、L-イソロイシン、L-メチオニンまたはL-トリプトファン要求性を有するコリネ型細菌（特開昭54-44096号）；ケトマロン酸、フルオロマロン酸又はモノフルオロ酢酸に耐性を有するコリネ型細菌（特開昭57-18989号）；アルギニノールに耐性を有するコリネ型細菌（特開昭62-24075号）；X-グアニジン（Xは脂肪酸又は脂肪鎖の誘導体）に耐性を有するコリネ型細菌（特開平2-186995号）等が

挙げられる。

【0015】

具体的には、下記のような菌株を例示することができる。

プレビバクテリウム・フラバムAJ11169 (FERM P-4161)

プレビバクテリウム・ラクトファーメンタムAJ12092 (FERM P-7273)

プレビバクテリウム・フラバムAJ11336 (FERM P-4939)

プレビバクテリウム・フラバムAJ11345 (FERM P-4948)

プレビバクテリウム・ラクトファーメンタムAJ12430 (FERM BP-2228)

【0016】

AJ11169株及びAJ12092株は特開昭54-44096号記載の2-チアゾールアラニン耐性株、AJ11336株は特公昭62-24075号記載のアルギニノール耐性及びサルファダイアジン耐性を有する株、AJ11345株は特公昭62-24075号記載のアルギニノール耐性、2-チアゾールアラニン耐性、サルファグアニジン耐性、及びヒスチジン要求性を有する株、及びAJ12430株は特開平2-186995号記載のオクチルグアニジン耐性及び2-チアゾールアラニン耐性を有する株である。

【0017】

リプレッサーが正常に機能しないコリネ型細菌は、argR遺伝子が、該遺伝子産物であるアルギニンリプレッサーの活性が低下又は消失するか、又はargR遺伝子の転写が低下または消失するように、改変することによって得られる。このようなコリネ型細菌は、例えば、遺伝子組換え法を用いた相同組換え法 (Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory press (1972); Matsuyama, S. and Mizushima, S., J. Bacteriol., 162, 1196(1985)) により、染色体上のargR遺伝子を、正常に機能しないargR遺伝子（以下、「破壊型argR遺伝子」ということがある）で置換することによって行うことができる。

【0018】

染色体上の配列と相同性を有する配列を持つプラスミド等が菌体内に導入されると、ある頻度で相同性を有する配列の箇所で組換えを起こし、導入されたプラスミド全体が染色体上に組み込まれる。この後さらに染色体上の相同性を有する

配列の箇所で組換えを起こすと、再びプラスミドが染色体上から抜け落ちるが、この時組換えを起こす位置により破壊された遺伝子の方が染色体上に固定され、元の正常な遺伝子がプラスミドと一緒に染色体上から抜け落ちることもある。このような菌株を選択することにより、染色体上の正常なargR遺伝子が破壊型argR遺伝子と置換された菌株を取得することができる。

【0019】

このような相同組換えによる遺伝子破壊技術は既に確立しており、直鎖DNAを用いる方法、温度感受性プラスミドを用いる方法等が利用できる。また、薬剤耐性等のマーカー遺伝子が内部に挿入されたargR遺伝子を含み、かつ、目的とするコリネ型細菌細胞内で複製できないプラスミドを用いることによっても、argR遺伝子の破壊を行うことができる。すなわち、前記プラスミドで形質転換され、薬剤耐性を獲得した形質転換体は、染色体DNA中にマーカー遺伝子が組み込まれている。このマーカー遺伝子は、その両端のargR遺伝子配列と染色体上のargR遺伝子との相同組換えによって組み込まれる可能性が高いため、効率よく遺伝子破壊株を選択することができる。

【0020】

遺伝子破壊に用いる破壊型argR遺伝子は、具体的には、制限酵素消化及び再結合によるargR遺伝子の一定領域の欠失、argR遺伝子への他のDNA断片（マーカー遺伝子等）の挿入、または部位特異的変異法（Kramer, W. and Frits, H. J., *Methods in Enzymology*, 154, 350 (1987)）や次亜硫酸ナトリウム、ヒドロキシルアミン等の化学薬剤による処理（Shortle, D. and Nathans, D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75, 270 (1978)）によって、argR遺伝子のコーディング領域またはプロモーター領域等の塩基配列の中に1つまたは複数個の塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を起こさせることにより、コードされるリプレッサーの活性を低下又は消失させるか、又はargR遺伝子の転写を低下または消失させることにより、取得することができる。これらの態様の中では、制限酵素消化及び再結合によりargR遺伝子の一定領域を欠失させる方法、又はargR遺伝子へ他のDNA断片を挿入する方法が、確実性及び安定性の点から好ましい。また、argR遺伝子とその周辺領域を含むプラスミドを鋳型とし、argR遺伝子の末端部又は

周辺領域に相当するプライマーを用いてPCR（ポリメラーゼ・チェイン・リアクション）を行い、argR遺伝子の内部又は全体を除く部分を増幅し、得られる増幅産物を環状化することによって、argR遺伝子破壊用プラスミドを作製することができる。後記実施例では、この方法によってargR遺伝子を破壊した。

【0021】

argR遺伝子は、コリネ型細菌の染色体DNAから、既知のargR遺伝子の塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとするPCR法によって取得することができる。また、コリネ型細菌の染色体DNAライブラリーから、既知のargR遺伝子の塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプローブとするハイブリダイゼーション法によって、argR遺伝子を取得することができる。尚、本発明においては、argR遺伝子は破壊型argR遺伝子の作製に用いるため、必ずしも全長を含む必要はなく、遺伝子破壊を起こすのに必要な長さを有していればよい。

【0022】

argR遺伝子は、コリネ型細菌のargR遺伝子と相同組換えを起こす程度の相同性を有していれば、由来を特に制限されない。コリネ型細菌のargR遺伝子として具体的には、配列番号17に示す塩基配列を有するプレビバクテリウム・フラバムのargR遺伝子、及び、コリネバクテリウム・グルタミカムのargR遺伝子(GenBank accession AF049897)が挙げられる。これらのargR遺伝子は相同性が高く、argR遺伝子を破壊するコリネ型細菌と種又は属が異なるコリネ型細菌のargR遺伝子であっても、遺伝子破壊に用いることができると考えられる。

本発明において、配列番号18に示すアミノ酸配列又は同アミノ酸配列と相同性を有するアミノ酸配列とは、配列番号18に示すアミノ酸配列をコードするargG遺伝子(例えば配列番号17に示す塩基配列を有するargG遺伝子)と相同組換えを起こす程度の相同性を有するargG遺伝子によってコードされるアミノ酸配列を意味する。

【0023】

PCRに用いるプライマーとしては、argR遺伝子を増幅することができるものであればよく、具体的には配列番号19及び配列番号20に示す塩基配列を有する

オリゴヌクレオチドが挙げられる。

【0024】

また、マーカー遺伝子としては、カナマイシン耐性遺伝子等の薬剤耐性遺伝子が挙げられる。カナマイシン耐性遺伝子は、ストレプトコッカス・フェカリスのカナマイシン耐性遺伝子を含む公知のプラスミド、例えばpDG783 (Anne-Marie G uerout-Fleury et al., Gene, 167, 335-337(1995)) からPCRにより増幅することにより取得することができる。

【0025】

マーカー遺伝子として薬剤耐性遺伝子を用いる場合は、該遺伝子をプラスミド中のargR遺伝子の適当な部位に挿入し、得られるプラスミドで微生物を形質転換し、薬剤耐性となった形質転換体を選択すれば、argR遺伝子破壊株が得られる。染色体上のargR遺伝子が破壊されたことは、サザンプロットティングやPCR法により、染色体上のargR遺伝子又はマーカー遺伝子を解析することによって、確認することができる。前記カナマイシン耐性遺伝子が染色体DNAに組み込まれたことの確認は、カナマイシン耐性遺伝子を増幅することができるプライマー（例えば配列番号1及び2に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド）を用いたPCRにより、行うことができる。

【0026】

上記のようにして得られるアルギニンリプレッサーが正常に機能せず、かつ、L-アルギニン生産能を有するコリネ型細菌を培地で培養し、該培養物中にL-アルギニンを生成蓄積せしめ、該培養物からL-アルギニンを採取することにより、L-アルギニンを効率よく製造することができる。

【0027】

使用する培地は、微生物を用いたアミノ酸の発酵生産に従来より用いられてきた周知の培地を用いてかまわない。つまり、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機成分を含有する通常の培地である。

【0028】

炭素源としては、グルコース、シュクロース、ラクトース、ガラクトース、フランクトースやでんぷんの加水分解物などの糖類、グリセロールやソルビトールな

どのアルコール類、フマール酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸類を用いることができる。

【0029】

窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。

【0030】

有機微量栄養源としては、ビタミンB₁、L-ホモセリンなどの要求物質または酵母エキス等を適量含有させることが望ましい。これらの他に、必要に応じて、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。

【0031】

培養は好気的条件下で1～7日間実施するのがよく、培養温度は24℃～37℃、培養中のpHは5～9がよい。尚、pH調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、更にアンモニアガス等を使用することができる。発酵液からのL-アルギニンの採取は通常イオン交換樹脂法その他の公知の方法を組み合わせることにより実施できる。

【0032】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

【0033】

【実施例1】エシェリヒア・コリとコリネ型細菌のシャトルベクター及び温度感受性ベクターの構築

はじめに、コリネ型細菌にargR遺伝子を導入するためのベクター、及びコリネ型細菌のargR欠失株を作製するための温度感受性ベクターを構築した。

<1>ストレプトコッカス・フェカリスの薬剤耐性遺伝子を持つベクターの構築

ストレプトコッカス・フェカリスのカナマイシン耐性遺伝子を、同遺伝子を含む公知のプラスミドからPCRにより増幅した。ストレプトコッカス・フェカリスのカナマイシン耐性遺伝子の塩基配列は既に明らかにされている (Trieu-Cuot, P

and Courvalin, P.: Gene 23 (3), 331-341 (1983)）。この配列を基に配列番号1および2に示すプライマーを合成し、pDG783 (Anne-Marie Guerout-Fleury et al., Gene, 167, 335-337(1995)) を鋳型としてPCRを行ない、カナマイシン耐性遺伝子とそのプロモーターを含むDNA断片を増幅した。

【0034】

上記DNA断片を宝酒造社製のSUPREC02にて精製した後、制限酵素HindIIIとHincIIで完全分解し平滑末端化した。平滑末端化は宝酒造社製のBlunting Kitにより行なった。このDNA断片と、配列番号3および4に示すプライマーを用いてpHS399(S.Takeshita et al : Gene 61,63-74(1987)参照)を鋳型としてPCRを行って得られた増幅産物を精製し平滑末端化したDNA断片とを、混合し連結した。連結反応は宝酒造社製 DNA ligation kit ver2にて行なった。連結したDNAを用いて、エシェリヒア・コリJM109のコンピテントセル（宝酒造社製）を形質転換し、IPTG (イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド) 10 μ g/ml、X-Gal (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトシド) 40 μ g/ml及びカナマイシン25 μ g/mlを含むL培地 (バクトリリプトン10g/L、バクトイーストエキストラクト5g/L、NaCl 5g/L、寒天15g/L、pH7.2) に塗布し、一晩培養後、出現した青色のコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換株を得た。

【0035】

形質転換株からアルカリ法（生物工学実験書、日本生物工学会編、105頁、培風館、1992年）を用いてプラスミドを調製し、制限酵素地図を作成し、図1に示す制限酵素地図と同等であるものをpK1と名付けた。このプラスミドはエシェリヒア・コリ中にて安定に保持され、宿主にカナマイシン耐性を付与する。また、lazZ' 遺伝子を含むため、クローニングベクターに適している。

【0036】

<2>シャトルベクターpSFK6の構築

温度感受性複製制御領域の取得の材料として、エシェリシア・コリと、コリネ型細菌の双方の菌体中で自律複製可能なプラスミドベクターを作製した。プレビバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869より抽出したプラスミドpAM330(特開昭58-67699号公報参照)を制限酵素HindIIIで完全分解したのち平滑末端化し

、これと、上記pK1を制限酵素BsaAIで完全分解したものを、連結した。連結後のDNAを用いてプレビバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869を形質転換した。形質転換の方法は、電気パルス法（特開平2-207791号参照）を用いた。形質転換体の選択は、カナマイシン $25\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むM-CM2Bプレート（ポリペプトン10g/L、酵母エキス10g/L、NaCl 5g/L、ビオチン $10\mu\text{g}/\text{L}$ 、寒天15g/L、pH7.2）にて行った。二晩培養後、コロニーを釣り上げ单コロニー分離し、形質転換体とした。形質転換体からプラスミドDNAを調製し、制限酵素地図を作成し、図2に示す制限酵素切断地図と同一の制限酵素地図を持つものをpSFK6と命名した。このプラスミドは、エシェリシア・コリとコリネ型細菌中で自律複製でき、宿主にカナマイシン耐性を付与する。

【0037】

<3>温度感受性複製制御領域をもつプラスミドの取得

pSFK6をインピトロでヒドロキシルアミン処理した。ヒドロキシルアミン処理は、公知の方法（G. O. Humpherys et al., Molec. Gen. Genet., 145, 101-108 (1976)等参照）によった。処理後のDNAを回収し、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869株を形質転換した。形質転換体は、カナマイシン $25\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むCM2Bプレート上で低温(25°C)にて選択した。出現した形質転換体を、同様の選択プレートにレプリカし、高温(34°C)にて培養した。高温でカナマイシンを含む選択プレート上で生育できない株1株を取得した。この株から、プラスミドを回収しp48Kと命名した。

【0038】

<4>温度感受性複製制御領域の塩基配列の決定

野生型の複製制御領域を持つプラスミドpSFK6、および温度感受性型の複製制御領域を持つプラスミドp48Kについて、それぞれの複製制御領域部分の塩基配列を決定した。塩基配列は、ABI社のDNA Sequencing Kitを用いてABI社の全自动シーケンサーABI310にて決定した。その結果、野生型複製制御領域と、温度感受性変異型複製制御領域の間には、6個の塩基置換があることが判明した。pSFK6に含まれるコリネ型細菌中で機能する複製制御領域部分（pAM330由来の全配列）の塩基配列を配列番号5に、p48Kに含まれるコリネ型細菌中で機能する温度感受性

複製制御領域部分の塩基配列を配列番号7に示す。また、これらの塩基配列中に存在するORFによってコードされ得るアミノ酸配列を配列番号6及び8に示す。温度感受性複製制御領域では、配列上の1255番目のCがTに、1534番目のCがTに、1866番目のGがAに、2058番目のGがAに、2187番目のCがTに、3193番目のGがAに変異している。このうちアミノ酸変異を伴うものは1534番目の変異点のみであり、プロリンからセリンへの置換を引き起こす。

【0039】

<5>温度感受性変異を有するシャトルベクターの構築

p48Kが持つ6個の変異を、一点ずつシャトルベクターpSFK6に導入した（図3参照）。変異の導入は、公知の方法（Mikaelian, I., Sergeant, A. Nucleic Acids Res., 20, 376 (1992)）によって行った。具体的方法を以下に示す。3193番目のG→Aの変異を導入するために、配列番号9および10に示すプライマーの組み合わせと、配列番号11および12に示すプライマーの組み合わせを用いて、pAM330を鑄型としてPCRを行なった。得られた増幅産物はそれぞれアガロースゲルで電気泳動後、ゲルから回収することにより精製した。ゲルからのDNA断片の回収は宝酒造社製のEASYTRAP Ver.2にて行なった。精製したDNAを1:1のモル比となるように混合し、これを鑄型として配列番号13および14に示すプライマーを用いてPCR反応を行なった。増幅産物は制限酵素MluIで完全分解し、アガロースゲルにて電気泳動後、およそ3.2KbのDNA断片を回収した。pSFK6も同様に制限酵素MluIで完全分解し、アガロースゲルにて電気泳動後、およそ3.8KbのDNA断片を回収した。得られたDNA断片を混合して連結し、エシェリヒア・コリJM109のコンピテントセル（宝酒造社製）を用いて形質転換を行い、カナマイシン $25\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むL培地に塗布し、一晩培養後、出現したコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換株を得た。形質転換株からアルカリ法を用いてプラスミドを調製し、塩基配列を決定し、配列番号5に示す配列の3193番目のGがAに変異していることを確認した。このプラスミドをpSFKT6と名付けた（図3）。

【0040】

【実施例2】argR遺伝子のクローニングとコリネ型細菌での増幅効果

プレビバクテリウム・フラバム野生株2247 (AJ14067) の染色体DNAを鑄型とし

、配列番号15（配列番号17の塩基番号1717から1741の配列）および配列番号16（配列番号17の塩基番号2386から2362の配列に相補的な配列）に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（プライマー1，2）をプライマーとしてPCRを行った。PCRは、*Pyrobest DNA polymerae*（宝酒造）を用い、98℃10秒、58℃1分、72℃3分を1サイクルとして30サイクル行った。得られた增幅断片を、実施例1で得たシャトルベクターpSFK6の*Sma*Iサイトに挿入し、コリネ型細菌で自律複製可能なプラスミドpWRを得た。

【0041】

コリネ型細菌のL-アルギニン生産菌でのargR遺伝子の増幅効果を調べるため、pWRをL-アルギニン生産菌ブレビバクテリウム・フラバムAJ113455株（FERM BP-6894）に導入した。プラスミドの導入は、電気パルス法（特開平2-207791号）を用いた。形質転換体は、カナマイシン25μg/mlを含むCM2G寒天培地（グルコース5g、NaCl 5g、寒天15gを純水1Lに含む。pH7.2）にてカナマイシン耐性株として選択し、AJ11345/pWRを得た。対照として、AJ113455株にpSFK6を同様にして導入し、形質転換体AJ11345/pSFK6を得た。

【0042】

上記各菌株を、グルコース0.5g/dl、ポリペプトン 1g/dl、酵母エキス 1g/dl、NaCl 0.5g/dlを含む寒天培地にぬりつけ、31.5℃で20時間培養した。得られた菌体1エーゼを、グルコース4g/dl、硫酸アンモニウム6.5g/dl、KH₂PO₄ 0.1g/dl、MgSO₄ 0.04g/dl、FeSO₄ 0.001g/dl、MnSO₄ 0.001g/dl、ビタミンB₁ 5μg/dl、ビオチン5μg/dl、大豆加水分解物（N量として45mg/dl）を含む培地に植菌し、フラスコにて31.5℃で50時間振とう培養を行った。各々の培養液中のL-アルギニン蓄積量（濃度(g/dl)）を測定した結果を表1に示す。その結果、argR増幅株では、ほとんどL-アルギニンを蓄積しなくなった。このことから、argR遺伝子産物がアルギニンリプレッサーとして機能していることが示された。

【0043】

【表1】

表1

菌株	L-アルギニン蓄積量 (g/dl)
AJ11345/pSFK6	1.3
AJ11345/pWR	0.2

【0044】

pWRにクローニングされた挿入断片の塩基配列を決定した結果を配列番号17に示す。同塩基配列によってコードされ得るアミノ酸配列を配列番号18に示す。

【0045】

【実施例3】コリネ型細菌のargR破壊株の構築及びアルギニンリプレッサー欠失の効果

<1>argR破壊用プラスミドの作製

ブレビバクテリウム・フラバム野生株2247株(AJ14067)の染色体DNAを鑄型とし、配列番号19(配列番号17の塩基番号4から28の配列)および配列番号20(配列番号17の塩基番号4230から4211の配列に相補的な配列)に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(プライマー3, 4)をプライマーとしてPCRを行った。PCRは、Pyrobest DNA polymerae(宝酒造)を用い、98℃10秒、58℃1分、72℃3分を1サイクルとして30サイクル行った。得られた増幅断片を、クローニングベクターpHSG399のマルチクローニングサイト内のSmaIサイトに挿入した。

【0046】

挿入されたDNA断片からアルギニンリプレッサーをコードしていると思われるORF全てを欠失させるために、配列番号21(配列番号17の塩基番号2372から2395の配列)および配列番号22(配列番号17の塩基番号1851から1827の配列に相補的な配列)に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(プライマー5, 6)をプライマーとし、増幅断片が挿入されたpHSG399を鑄型をしてPCRを行った。PCR産物をセルフライゲーションすることにより、pssERを構築した。

【0047】

次に、pssERを制限酵素SmaIおよびSalIで消化して得た断片と、実施例1で得た温度感受性プラスミドpSFKT6をSmaI、SalIで消化したものを連結することにより、コリネ型細菌で自律複製能が温度感受性になったargR破壊用プラスミドpssERTを得た。

【0048】

<2>相同組換えによるコリネ型細菌のアルギニンリプレッサー欠失株の取得

上記のようにして得たプラスミドpssERTを、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムAJ13029株 (FERM BP-5189) に導入した。プラスミドの導入は電気パルス法（特開平2-207791号）を用いた。本プラスミドは、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム中で自律複製能が温度感受性である為、本プラスミドが相同組換えによって染色体に組み込まれた株のみが、プラスミド複製の非許容温度である34℃でカナマイシン耐性株として選択できる。argR破壊用プラスミドが染色体に組み込まれた株は、25 μg/mlのカナマイシンを含むCM2G培地プレート（ポリペプトン10g、酵母エキス10g、グルコース5g、NaCl 5g、寒天15gを純水1Lに含む。pH7.2）にて、カナマイシン耐性株として選択した。この段階では、染色体由来の正常なargR遺伝子と、プラスミド由来のORFが欠失したargG遺伝子とが、プラスミド部分を挟んで染色体上にタンデムに存在する。

【0049】

次に、組換え株を、再度相同組換えを起こさせ、プラスミド複製の非許容温度34℃でカナマイシン感受性になった株を選択することにより、プラスミド部分とともにargR遺伝子の一方が脱落した株を選択した。これらの株は、染色体上に正常なargR遺伝子が残された株と、破壊型argR遺伝子が残された株とが存在する。これらの中から、破壊型argR遺伝子のみを保持する株を選択した。染色体上のargR遺伝子が破壊型であるかどうかは、34℃でカナマイシン感受性になった株の染色体を調製し、これを鑄型とし、配列番号19および配列番号20に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(プライマー3, 4)をプライマーとしてPCRを行い、親株由来の染色体を鑄型にして同様にPCRを行ったものよりも、PCR産物が約600bp短くなることで確認することができる。

【0050】

上記のようにして選択されたargR破壊株のPCR産物のダイレクトシーケンスを行い、目的どおりargR遺伝子が破壊されていることを確認し、AJ13029△R株を得た。

【0051】

<3>argR破壊株によるL-アルギニンの生産

AJ13029△R株を、グルコース0.5g/dl、ポリペプトン 1g/dl、酵母エキス 1g/dl、NaCl 0.5g/dlを含む寒天培地にぬりつけ、31.5℃で20時間培養した。得られた菌体1エーゼを、グルコース3g/dl、硫酸アンモニウム6.5g/dl、 KH_2PO_4 0.1g/dl、 MgSO_4 0.04g/dl、 FeSO_4 0.001g/dl、 MnSO_4 0.001g/dl、ビタミンB₁ 300 μg/dl、ビオチン200 μg/dl、大豆加水分解物（N量として165mg/dl）を含み、NaOHでpH7.0に調整した培地に植菌し、31.5℃で24時間シード培養を行った。

【0052】

上記シード培養液1mlを、グルコース4g/dl、硫酸アンモニウム6.5g/dl、 KH_2PO_4 0.5g/dl、 MgSO_4 0.04g/dl、 FeSO_4 0.001g/dl、 MnSO_4 0.01g/dl、ビタミンB₁ 5 μg/dl、ビオチン5 μg/dl、大豆加水分解物（N量として45mg/dl）を含み、KOHでpHを7.0に調整した培地に植菌し、フラスコにて31.5℃で50時間振とう培養を行った。各菌株の培養液中のL-アルギニン蓄積量（濃度(mg/dl)）を測定した結果を表2に示す。その結果、argR破壊株は、親株に比べて著量のL-アルギニンを生成した。

【0053】

【表2】

表2

菌株	L-アルギニン蓄積量 (mg/dl)
AJ13029	20
AJ13029△R	120

【0054】

【配列表の説明】

配列番号1：ストレプトコッカス・フェカリスのカナマイシン耐性遺伝子増幅用プライマー

配列番号2：ストレプトコッカス・フェカリスのカナマイシン耐性遺伝子増幅用プライマー

配列番号3：pHSG399のベクター部分増幅用プライマー

配列番号4：pHSG399のベクター部分増幅用プライマー

配列番号5：pSFK6の複製制御領域部分の塩基配列

配列番号6：pSFK6中のORFによってコードされ得るアミノ酸配列

配列番号7：p48Kの複製制御領域部分の塩基配列

配列番号8：p48K中のORFによってコードされ得るアミノ酸配列

配列番号9：pSFK6に3193番目のG→Aの変異を導入するための第1回目PCR用プライマー

配列番号10：pSFK6に3193番目のG→Aの変異を導入するための第1回目PCR用プライマー

配列番号11：pSFK6に3193番目のG→Aの変異を導入するための第1回目PCR用プライマー

配列番号12：pSFK6に3193番目のG→Aの変異を導入するための第1回目PCR用プライマー

配列番号13：pSFK6に3193番目のG→Aの変異を導入するための第2回目PCR用プライマー

配列番号14：pSFK6に3193番目のG→Aの変異を導入するための第2回目PCR用プライマー

配列番号15：argR遺伝子増幅用プライマー

配列番号16：argR遺伝子増幅用プライマー

配列番号17：argR遺伝子を含むDNA断片の塩基配列

配列番号18：前記DNA断片がコードし得るアミノ酸配列

配列番号19：argR遺伝子増幅用プライマー

配列番号20：argR遺伝子増幅用プライマー

配列番号21：argR遺伝子を含むプラスミドのargR遺伝子ORF以外の部分を増幅するためのプライマー

配列番号22：argR遺伝子を含むプラスミドのargR遺伝子ORF以外の部分を増幅するためのプライマー

【0055】

【発明の効果】

本発明により、L-アルギニン生産能を有するコリネ型細菌のL-アルギニン生産能を向上させることができる。

【0056】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> 味の素株式会社

<120> コリネ型細菌のアルギニンリプレッサー欠失株及びL-アルギニンの製造法

<130> P-7232

<140>

<141> 2000-04-28

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.0

【0057】

<210> 1

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
amplifying kanamycin resistant gene of
Streptococcus faecalis

<400> 1

cccgtaact gcttcaaacc caggacaata ac 32
【0058】

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
amplifying kanamycin resistant gene of
Streptococcus faecalis

<400> 2

cccgtaaca tgtacttcag aaaagattag 30
【0059】

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for

amplifying Escherichia coli cloning vector pHSG399

<400> 3

gatatctacg tgccgatcaa cgtctc

26

[0060]

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for

amplifying Escherichia coli cloning vector pHSG399

<400> 4

aggcctttt ttaaggcagt tattg

25

[0061]

<210> 5

<211> 4447

<212> DNA

<213> Brevibacterium lactofermentum

<220>

<221> CDS

<222> (1318)..(2598)

<400> 5

aagcttgtct acgtctgatg ctgtaatcg gacggacttg ccgatcttgt atgcgggtat 60

tttccctcg ttgcccaact tttaatggc ggccgggtg agagctacgc gggcggcgac 120

ctgctgcgt gtgatccaat attcgggtc gttcactggc tccccttct gatttctggc 180
 atagaagaac ccccgtaac tgtgtggtc cgggggtgc tgattttgc gagacttctc 240
 gcgcattcc ctagcttagg tgaaaacacc atgaaacact agggaaacac ccatgaaaca 300
 cccattaggg cagtagggcg gcttcttgc ctagggcttg catttggcg gtgatctggc 360
 cttagcgtg tgaaagtgtg tcgttaggtgg cgtgctcaat gcactcgaac gtcacgtcat 420
 ttaccggc acgggtggca aagagaacta gtgggtttaga cattgtttc ctcgttgtcg 480
 gtggtggtga gctttctag ccgctcgta aacgcggcga tcatgaactc ttggagggtt 540
 tcaccgttct gcatgcctgc gcgcttcatg tcctcacgta gtgccaaagg aacgcgtgcg 600
 gtgaccacga cgggcttagc cttgcctgc gcttcttagt cttcgatggc ggcttgtgcc 660
 tgcgcttgct ggcctgttag tgccctgtga gcttcttgta gttgctgttc tagctgtgcc 720
 ttggttgcca tgcttaaga ctctagtagc ttccctgcga tatgtcatgc gcatgcgttag 780
 caaacattgt cctgcaactc attcattatg tgcagtgcctc ctgttactag tcgtacatac 840
 tcatatttac ctagctgca tgcagtgcatttgc acatgcag tcatgtcgta ctaatgtgt 900
 aaacatgtac atgcagatttgc tgggggtgc agggggcggg gccaccctgt ccatgcgggg 960
 tgtgggctt gccccccgg tacagacagt gagcaccggg gcaccttagtgc gcggataacc 1020
 cccctaggta tcggacacgt aaccctccca tgcgtatgc aatcttaac attgagtagc 1080
 ggtaaagctgg cacgcatacg caagcttaggc ggcacccaaa caccactaaa attaatagt 1140
 ccctagacaa gacaaacccc cgtgcgagct accaactcat atgcacgggg gccacataac 1200
 ccgaagggtt tcaatttgc aaccatagca ctagctaaga caacgggcac aacacccgca 1260
 caaactcgca ctgcgcacc ccgcacaaca tcgggtcttag gtaacactga aatagaa 1317
 gtg aac acc tct aag gaa ccg cag gtc aat gag ggt tct aag gtc act 1365
 Val Asn Thr Ser Lys Glu Pro Gln Val Asn Glu Gly Ser Lys Val Thr

1	5	10	15														
cgc	gct	agg	gcg	tgg	cgt	agg	caa	aac	gtc	atg	tac	aag	atc	acc	aat		1413
Arg	Ala	Arg	Ala	Trp	Arg	Arg	Gln	Asn	Val	Met	Tyr	Lys	Ile	Thr	Asn		
20		25		30													
agt	aag	gct	ctg	gcg	ggg	tgc	cat	agg	tgg	cgc	agg	gac	gaa	gct	gtt		1461
Ser	Lys	Ala	Leu	Ala	Gly	Cys	His	Arg	Trp	Arg	Arg	Asp	Glu	Ala	Val		

gcg gtg tcc tgg tcg tct aac ggt gct tcg cag ttt gag ggt ctg caa 1509
 Ala Val Ser Trp Ser Ser Asn Gly Ala Ser Gln Phe Glu Gly Leu Gln
 50 55 60
 aac tct cac tct cgc tgg ggg tca cct ctg gct gaa ttg gaa gtc atg 1557
 Asn Ser His Ser Arg Trp Gly Ser Pro Leu Ala Glu Leu Glu Val Met
 65 70 75 80
 ggc gaa cgc cgc att gag ctg gct att gct act aag aat cac ttg gcg 1605
 Gly Glu Arg Arg Ile Glu Leu Ala Ile Ala Thr Lys Asn His Leu Ala
 85 90 95
 gcg ggt ggc gcg ctc atg atg ttt gtg ggc act gtt cga cac aac cgc 1653
 Ala Gly Gly Ala Leu Met Met Phe Val Gly Thr Val Arg His Asn Arg
 100 105 110
 tca cag tca ttt gcg cag gtt gaa gcg ggt att aag act gcg tac tct 1701
 Ser Gln Ser Phe Ala Gln Val Glu Ala Gly Ile Lys Thr Ala Tyr Ser
 115 120 125
 tcg atg gtg aaa aca tct cag tgg aag aaa gaa cgt gca cgg tac ggg 1749
 Ser Met Val Lys Thr Ser Gln Trp Lys Lys Glu Arg Ala Arg Tyr Gly
 130 135 140
 gtg gag cac acc tat agt gac tat gag gtc aca gac tct tgg gcg aac 1797
 Val Glu His Thr Tyr Ser Asp Tyr Glu Val Thr Asp Ser Trp Ala Asn
 145 150 155 160
 ggt tgg cac ttg cac cgc aac atg ctg ttg ttc ttg gat cgt cca ctg 1845
 Gly Trp His Leu His Arg Asn Met Leu Leu Phe Leu Asp Arg Pro Leu
 165 170 175
 tct gac gat gaa ctc aag gcg ttt gag gat tcc atg ttt tcc cgc tgg 1893
 Ser Asp Asp Glu Leu Lys Ala Phe Glu Asp Ser Met Phe Ser Arg Trp
 180 185 190
 tct gct ggt gtg gtt aag gcc ggt atg gac gcg cca ctg cgt gag cac 1941
 Ser Ala Gly Val Val Lys Ala Gly Met Asp Ala Pro Leu Arg Glu His

195	200	205	
ggg gtc aaa ctt gat cag gtg tct acc tgg ggt gga gac gct gcg aaa			1989
Gly Val Lys Leu Asp Gln Val Ser Thr Trp Gly Gly Asp Ala Ala Lys			
210	215	220	
atg gca acc tac ctc gct aag ggc atg tct cag gaa ctg act ggc tcc			2037
Met Ala Thr Tyr Leu Ala Lys Gly Met Ser Gln Glu Leu Thr Gly Ser			
225	230	235	240
gct act aaa acc gcg tct aag ggg tcg tac acg ccg ttt cag atg ttg			2085
Ala Thr Lys Thr Ala Ser Lys Gly Ser Tyr Thr Pro Phe Gln Met Leu			
245	250	255	
gat atg ttg gcc gat caa agc gac gcc ggc gag gat atg gac gct gtt			2133
Asp Met Leu Ala Asp Gln Ser Asp Ala Gly Glu Asp Met Asp Ala Val			
260	265	270	
ttg gtg gct cgg tgg cgt gag tat gag gtt ggt tct aaa aac ctg cgt			2181
Leu Val Ala Arg Trp Arg Glu Tyr Glu Val Gly Ser Lys Asn Leu Arg			
275	280	285	
tcg tcc tgg tca cgt ggg gct aag cgt gct ttg ggc att gat tac ata			2229
Ser Ser Trp Ser Arg Gly Ala Lys Arg Ala Leu Gly Ile Asp Tyr Ile			
290	295	300	
gac gct gat gta cgt cgt gaa atg gaa gaa gaa ctg tac aag ctc gcc			2277
Asp Ala Asp Val Arg Arg Glu Met Glu Glu Leu Tyr Lys Leu Ala			
305	310	315	320
ggt ctg gaa gca ccg gaa cgg gtc gaa tca acc cgc gtt gct gtt gct			2325
Gly Leu Glu Ala Pro Glu Arg Val Glu Ser Thr Arg Val Ala Val Ala			
325	330	335	
ttg gtg aag ccc gat gat tgg aaa ctg att cag tct gat ttc gcg gtt			2373
Leu Val Lys Pro Asp Asp Trp Lys Leu Ile Gln Ser Asp Phe Ala Val			
340	345	350	
agg cag tac gtt cta gat tgc gtg gat aag gct aag gac gtg gcc gct			2421

Arg Gln Tyr Val Leu Asp Cys Val Asp Lys Ala Lys Asp Val Ala Ala
 355 360 365
 gcg caa cgt gtc gct aat gag gtg ctg gca agt ctg ggt gtg gat tcc 2469
 Ala Gln Arg Val Ala Asn Glu Val Leu Ala Ser Leu Gly Val Asp Ser
 370 375 380
 acc ccg tgc atg atc gtt atg gat gat gtg gac ttg gac gcg gtt ctg 2517
 Thr Pro Cys Met Ile Val Met Asp Asp Val Asp Leu Asp Ala Val Leu
 385 390 395 400
 cct act cat ggg gac gct act aag cgt gat ctg aat gcg gcg gtg ttc 2565
 Pro Thr His Gly Asp Ala Thr Lys Arg Asp Leu Asn Ala Ala Val Phe
 405 410 415
 gcg ggt aat gag cag act att ctt cgc acc cac taaaagcggc ataaaccccg 2618
 Ala Gly Asn Glu Gln Thr Ile Leu Arg Thr His
 420 425
 ttcgatattt tgtgcgatga atttatggtc aatgtcgccg gggcaaacta tgatgggtct 2678
 tgggttgac aatggctgat ttcatcagga atggaactgt catgctgtta tgtgcctggc 2738
 tcctaataa agctggggac aatgggttc cccgttgatc tgatctagtt cggattggcg 2798
 gggcttcaact gtatctgggg gtggcatcgt gaatagattt cacaccgtt tggcagtgt 2858
 gcacaccata gtgggcatga gtaataccta cgcgcgcgtt ggctagggtt taacgcgcgt 2918
 ttgcgtgc tgcgggcat acgttagcgc atacgtttt ttctgtaaaa ccttttgtt 2978
 ttgttgtttc gtgttggtt ctttctgtt ggcggggcaa cttAACGCTT gcgggggtgg 3038
 ttgttgacgt taacgggggtt agttttattt cccctagttt ttttcagta cgacaatcga 3098
 gaaagacctt tttcagccag ttcgggtcat gttcgtcggtt atggccacgtt gcatagcgcac 3158
 cagttttcga gttcactggg attttgggtt catcgaacaa gatgttaggac aatgcggttt 3218
 cttaggtctac ttttgcattt atgccgtaca agccccgtgg gtattcagcg attgattcca 3278
 aggccggcttc ccagtcctgtt tttgtgaagg actggcttag ttctagggtt gtgtctgggt 3338
 agtactgctt gtttgttaa gcccgttgg tgctcattga tgattccctt gaagtgtttt 3398
 gagttcggctt agtagtgcgg cgtatggtgc tgcttttgc tcgtgatagc tcgccttggc 3458
 tatgaggtcg gcttaggtagg tttccgggtt gccttaggttgc cgttaggtcta gcaaatcccg 3518

gtatgtggcc tgtgcgctgc gctgggtggc catacagtcg ttaagctggg ctttacgtc 3578
 tgcgatgcgg tggcggttag gcatgttgtt gtgccttcc caagtactca cgggcgggtt 3638
 ttgttatgc ctggcgatgat gcttcattga gctgttgag ttccgcctgg agtgcggta 3698
 gttcgccgc gaactgcctg tggtactcgt atttctcttgc ttccctggcg atagcatttgc 3758
 cgttgaattt cagggcggtg agttcgtcca cgcgtcgaaa tgctgcgttg gtcatggtgg 3818
 cgtgccattt gcgggttgtgg acgcgggtt caaggttgcg cacggctgct tcggctagg 3878
 tggtggctgc tttttcagt gtcgggcctt cccgttcctc gtccaaacgag agcaccttgc 3938
 gtttggc ttcggctagt ttttgcctct ccgcatttgcg gagttggtca acttcgttt 3998
 gggagaggc gttttcactg atgcgtcgaa tgtggcgtt gtgggtgctg agttggtgc 4058
 agaggtatgtt gggttctggg atttcggcga gttggcgtag gttgggttag tgccgggttgc 4118
 ggcctgggttgc gttgggttgc ctggggaggt cgatgtatcc gtttgagtct ccggcgtgg 4178
 tgaagtgaat taggcgttgg tagccgtatt cctgggttggg gaggtacgac agaatgagga 4238
 agttggtgc ttctcctgca atgagtcgtg cgtgttcgtt gttcggtact gggtcgtgt 4298
 cggggagaat gttctttgg gtcatggcctt ctctttctgt tgctctgtaa gtccgtatgt 4358
 gggcatggga aagccccggc aacccttgg gtcaaccggg gctagatagt cgcttagaat 4418
 ggcttcttagg ctgcgtctcg ggggtgtggc 4447

[0062]

<210> 6

<211> 427

<212> PRT

<213> **Brevibacterium lactofermentum**

<400> 6

Val Asn Thr Ser Lys Glu Pro Gln Val Asn Glu Gly Ser Lys Val Thr

1

5

10

15

Arg Ala Arg Ala Trp Arg Arg Gln Asn Val Met Tyr Lys Ile Thr Asn

20

25

30

Ser Lys Ala Leu Ala Gly Cys His Arg Trp Arg Arg Asp Glu Ala Val

35

40

45

Ala Val Ser Trp Ser Ser Asn Gly Ala Ser Gln Phe Glu Gly Leu Gln
 50 55 60
 Asn Ser His Ser Arg Trp Gly Ser Pro Leu Ala Glu Leu Glu Val Met
 65 70 75 80
 Gly Glu Arg Arg Ile Glu Leu Ala Ile Ala Thr Lys Asn His Leu Ala
 85 90 95
 Ala Gly Gly Ala Leu Met Met Phe Val Gly Thr Val Arg His Asn Arg
 100 105 110
 Ser Gln Ser Phe Ala Gln Val Glu Ala Gly Ile Lys Thr Ala Tyr Ser
 115 120 125
 Ser Met Val Lys Thr Ser Gln Trp Lys Lys Glu Arg Ala Arg Tyr Gly
 130 135 140
 Val Glu His Thr Tyr Ser Asp Tyr Glu Val Thr Asp Ser Trp Ala Asn
 145 150 155 160
 Gly Trp His Leu His Arg Asn Met Leu Leu Phe Leu Asp Arg Pro Leu
 165 170 175
 Ser Asp Asp Glu Leu Lys Ala Phe Glu Asp Ser Met Phe Ser Arg Trp
 180 185 190
 Ser Ala Gly Val Val Lys Ala Gly Met Asp Ala Pro Leu Arg Glu His
 195 200 205
 Gly Val Lys Leu Asp Gln Val Ser Thr Trp Gly Gly Asp Ala Ala Lys
 210 215 220
 Met Ala Thr Tyr Leu Ala Lys Gly Met Ser Gln Glu Leu Thr Gly Ser
 225 230 235 240
 Ala Thr Lys Thr Ala Ser Lys Gly Ser Tyr Thr Pro Phe Gln Met Leu
 245 250 255
 Asp Met Leu Ala Asp Gln Ser Asp Ala Gly Glu Asp Met Asp Ala Val
 260 265 270
 Leu Val Ala Arg Trp Arg Glu Tyr Glu Val Gly Ser Lys Asn Leu Arg

275	280	285
Ser Ser Trp Ser Arg Gly Ala Lys Arg Ala Leu Gly Ile Asp Tyr Ile		
290	295	300
Asp Ala Asp Val Arg Arg Glu Met Glu Glu Leu Tyr Lys Leu Ala		
305	310	315
Gly Leu Glu Ala Pro Glu Arg Val Glu Ser Thr Arg Val Ala Val Ala		
325	330	335
Leu Val Lys Pro Asp Asp Trp Lys Leu Ile Gln Ser Asp Phe Ala Val		
340	345	350
Arg Gln Tyr Val Leu Asp Cys Val Asp Lys Ala Lys Asp Val Ala Ala		
355	360	365
Ala Gln Arg Val Ala Asn Glu Val Leu Ala Ser Leu Gly Val Asp Ser		
370	375	380
Thr Pro Cys Met Ile Val Met Asp Asp Val Asp Leu Asp Ala Val Leu		
385	390	395
Pro Thr His Gly Asp Ala Thr Lys Arg Asp Leu Asn Ala Ala Val Phe		
405	410	415
Ala Gly Asn Glu Gln Thr Ile Leu Arg Thr His		
420	425	

【0063】

<210> 7

<211> 4447

<212> DNA

<213> **Brevibacterium lactofermentum**

<220>

<221> CDS

<222> (1318)..(2598)

<400> 7

aagcttgtct acgtctgatg ctttgaatcg gacggacttg ccgatcttgt atgcgggtat 60
 tttccctcg tttgcccact tttaatggc ggccgggtg agagctacgc gggcggcgcac 120
 ctgctgcgct gtgatccaat attcggggtc gttcactggc tccccttct gatttctggc 180
 atagaagaac ccccgtgaac tgtgtggttc cgggggttc tgattttgc gagacttctc 240
 gcgcaattcc ctagcttagg tgaaaacacc atgaaacact agggaaacac ccatgaaaca 300
 cccattaggg cagtagggcg gcttcttcgt ctagggcttg catttggcg gtgatctgg 360
 ctttagcgtg tgaaagtgtg tcgttaggtgg cgtgctcaat gcactcgaac gtcacgtcat 420
 ttaccgggtc acgggtggca aagagaacta gtgggtttaga cattgtttc ctcgttgcg 480
 gtgggtggta gccttcttag ccgctcggt aacgcggcga tcatgaactc ttggagggtt 540
 tcaccgttct gcatgcctgc gcgcttcatg tcctcacgta gtgccaaagg aacgcgtgcg 600
 gtgaccacga cgggcttagc cttgcctgc gcttcttagt cttcgatggt ggcttgc 660
 tgcgcttgct gcgcctgttag tgcctgttga gcttcttgcg tttgctgttc tagctgtgc 720
 ttgggttgcgca tgcttaaga ctctagtagc tttcctgcgta tatgtcatgc gcatgcgttag 780
 caaacattgt cctgcaactc attcattatg tgcagtgcgc ctgttactag tcgtacatac 840
 tcatatttac ctagtctgca tgcagtgcgt gcacatgcag tcatgtcgta ctaatgtgt 900
 aaacatgtac atgcagattg ctgggggtgc agggggcgga gccaccctgt ccatgcgggg 960
 tggggctt gccccccgg tacagacagt gagcaccggg gcacctagtc gcggataccc 1020
 cccctaggta tcggacacgt aaccctccca tgtcgatgca aatcttaac attgagtagc 1080
 ggttaagctgg cacgcatacg caagcttaggc ggccacccaaa caccactaaa attaatagt 1140
 tcctagacaa gacaaacccc cgtgcgagct accaactcat atgcacgggg gccacataac 1200
 ccgaagggtt ticaattgac aaccatagca ctagctaaga caacggcac aacatccgca 1260
 caaactcgca ctgcgcacc ccgcacaaca tcgggtctag gtaacactga aatagaa 1317
 gtg aac acc tct aag gaa ccg cag gtc aat gag ggt tct aag gtc act 1365
 Val Asn Thr Ser Lys Glu Pro Gln Val Asn Glu Gly Ser Lys Val Thr

1

5

10

15

cgc gct agg gcg tgg cgt agg caa aac gtc atg tac aag atc acc aat 1413

Arg Ala Arg Ala Trp Arg Arg Gln Asn Val Met Tyr Lys Ile Thr Asn

20

25

30

agt aag gct ctg gcg ggg tgc cat agg tgg cgc agg gac gaa gct gtt 1461
 Ser Lys Ala Leu Ala Gly Cys His Arg Trp Arg Arg Asp Glu Ala Val
 35 40 45
 gcg gtg tcc tgg tcg tct aac ggt gct tcg cag ttt gag ggt ctg caa 1509
 Ala Val Ser Trp Ser Ser Asn Gly Ala Ser Gln Phe Glu Gly Leu Gln
 50 55 60
 aac tct cac tct cgc tgg ggg tca tct ctg gct gaa ttg gaa gtc atg 1557
 Asn Ser His Ser Arg Trp Gly Ser Ser Leu Ala Glu Leu Glu Val Met
 65 70 75 80
 ggc gaa cgc cgc att gag ctg gct att gct act aag aat cac ttg gcg 1605
 Gly Glu Arg Arg Ile Glu Leu Ala Ile Ala Thr Lys Asn His Leu Ala
 85 90 95
 gcg ggt ggc gcg ctc atg atg ttt gtg ggc act gtt cga cac aac cgc 1653
 Ala Gly Gly Ala Leu Met Met Phe Val Gly Thr Val Arg His Asn Arg
 100 105 110
 tca cag tca ttt gcg cag gtt gaa gcg ggt att aag act gcg tac tct 1701
 Ser Gln Ser Phe Ala Gln Val Glu Ala Gly Ile Lys Thr Ala Tyr Ser
 115 120 125
 tcg atg gtg aaa aca tct cag tgg aag aaa gaa cgt gca cgg tac ggg 1749
 Ser Met Val Lys Thr Ser Gln Trp Lys Lys Glu Arg Ala Arg Tyr Gly
 130 135 140
 gtg gag cac acc tat agt gac tat gag gtc aca gac tct tgg gcg aac 1797
 Val Glu His Thr Tyr Ser Asp Tyr Glu Val Thr Asp Ser Trp Ala Asn
 145 150 155 160
 ggt tgg cac ttg cac cgc aac atg ctg ttg ttc ttg gat cgt cca ctg 1845
 Gly Trp His Leu His Arg Asn Met Leu Leu Phe Leu Asp Arg Pro Leu
 165 170 175
 tct gac gat gaa ctc aag gca ttt gag gat tcc atg ttt tcc cgc tgg 1893
 Ser Asp Asp Glu Leu Lys Ala Phe Glu Asp Ser Met Phe Ser Arg Trp

180	185	190	
tct gct ggt gtg gtt aag gcc ggt atg gac gcg cca ctg cgt gag cac			1941
Ser Ala Gly Val Val Lys Ala Gly Met Asp Ala Pro Leu Arg Glu His			
195	200	205	
ggg gtc aaa ctt gat cag gtg tct acc tgg ggt gga gac gct gcg aaa			1989
Gly Val Lys Leu Asp Gln Val Ser Thr Trp Gly Gly Asp Ala Ala Lys			
210	215	220	
atg gca acc tac ctc gct aag ggc atg tct cag gaa ctg act ggc tcc			2037
Met Ala Thr Tyr Leu Ala Lys Gly Met Ser Gln Glu Leu Thr Gly Ser			
225	230	235	240
gct act aaa acc gcg tct aaa ggg tcg tac acg ccg ttt cag atg ttg			2085
Ala Thr Lys Thr Ala Ser Lys Gly Ser Tyr Thr Pro Phe Gln Met Leu			
245	250	255	
gat atg ttg gcc gat caa agc gac gcc ggc gag gat atg gac gct gtt			2133
Asp Met Leu Ala Asp Gln Ser Asp Ala Gly Glu Asp Met Asp Ala Val			
260	265	270	
ttg gtg gct cgg tgg cgt gag tat gag gtt ggt tct aaa aac ctg cgt			2181
Leu Val Ala Arg Trp Arg Glu Tyr Glu Val Gly Ser Lys Asn Leu Arg			
275	280	285	
tcg tct tgg tca cgt ggg gct aag cgt gct ttg ggc att gat tac ata			2229
Ser Ser Trp Ser Arg Gly Ala Lys Arg Ala Leu Gly Ile Asp Tyr Ile			
290	295	300	
gac gct gat gta cgt cgt gaa atg gaa gaa gaa ctg tac aag ctc gcc			2277
Asp Ala Asp Val Arg Arg Glu Met Glu Glu Leu Tyr Lys Leu Ala			
305	310	315	320
ggt ctg gaa gca ccg gaa cgg gtc gaa tca acc cgc gtt gct gtt gct			2325
Gly Leu Glu Ala Pro Glu Arg Val Glu Ser Thr Arg Val Ala Val Ala			
325	330	335	
ttg gtg aag ccc gat gat tgg aaa ctg att cag tct gat ttc gcg gtt			2373

Leu Val Lys Pro Asp Asp Trp Lys Leu Ile Gln Ser Asp Phe Ala Val
 340 345 350
 agg cag tac gtt cta gat tgc gtg gat aag gct aag gac gtg gcc gct 2421
 Arg Gln Tyr Val Leu Asp Cys Val Asp Lys Ala Lys Asp Val Ala Ala
 355 360 365
 gcg caa cgt gtc gct aat gag gtg ctg gca agt ctg ggt gtg gat tcc 2469
 Ala Gln Arg Val Ala Asn Glu Val Leu Ala Ser Leu Gly Val Asp Ser
 370 375 380
 acc ccg tgc atg atc gtt atg gat gat gtg gac ttg gac gcg gtt ctg 2517
 Thr Pro Cys Met Ile Val Met Asp Asp Val Asp Leu Asp Ala Val Leu
 385 390 395 400
 cct act cat ggg gac gct act aag cgt gat ctg aat gcg gcg gtg ttc 2565
 Pro Thr His Gly Asp Ala Thr Lys Arg Asp Leu Asn Ala Ala Val Phe
 405 410 415
 gcg ggt aat gag cag act att ctt cgc acc cac taaaagcggc ataaaccccg 2618
 Ala Gly Asn Glu Gln Thr Ile Leu Arg Thr His
 420 425
 ttcgatattt tgtgcgtga atttatggtc aatgtcgccg gggcaaacta tgatgggtct 2678
 ttttgttgc aatggctgtat ttcatcagga atgaaactgt catgctgtta tgtgcctggc 2738
 tcctaatacaa agctggggac aatgggttgc cccgttgatc tgatcttagtt cggattggcg 2798
 gggcttcaact gatatgggg gtttttttttggcatcgt gaatagattt cacaccgtt tggcagtgt 2858
 gcacaccata gtgggcatga gtaataccata cgcgcgcgtg ggctagggtt taacgcgcgt 2918
 tttgccgtgc tgcggggcat acgttagcgc atacgtttt ttctgtaaaa ctttttttgt 2978
 ttgttgtttc gtgttgtttt cttttctgtt ggcggggcaa cttAACGCGCTT gccccgggtgg 3038
 ttgttgttgcgt taacgggggtt agtttttattt ccccttagtgg ttttttagtgcg cacaatcga 3098
 gaaagacctg tttcagccag ttccgggtcat gttcgtcggt atggccacgt gcatagcgcac 3158
 cagttttcga gttcactggg atttttgggtt catcaaacaa gatgttaggac aatgcgggtt 3218
 ctaggtctac tttttgtttt atgcgttaca agccccgtgg gtattcagcg attgattcca 3278
 aggccggcttc ccagtcgttgcgtt tttgtgaagg actggcttag ttcttaggtct gtgtctgggt 3338

agtactgctt gtttgttaa gcgcgcgtgg tgctcattga tgattccctt gaagtgtttg 3398
 gagttcggtc agtagtgcgg cgtatggtgc tgcttttgc tcgtgatagc tcgccttggc 3458
 tatgagggtcg gctaggtagg tttccgggtt gccttaggttg cgtaggtcta gcaaatcccc 3518
 gtatgtggcc tgtgcgtgc gctgggtggc catacagtcg ttaagctggg ctttacgtc 3578
 tgcgatgcgg tggcggttag gcatgttggt gtgcatttc caagtactca cgggcgggtt 3638
 ttgtgtatgc ctggcggtat gcttcttga gctgttggag ttccgcgtgg agtgcggta 3698
 gttcgtccgc gaactgcttg tggtaactcgt atttctcttg ttccctggcg atagcatttg 3758
 cgttgaattt cagggcggtg agttcgtcca cgctcggtt tgctgcgttg gtcatggtgg 3818
 cgtgccattt gcgggttgtgg acgcgggtt caaggttgcg cacggctgct tcggctaggt 3878
 tggtaactcgtc tttttcagt gctcggttgc cccgttccctc gtccaaacgag agcacctttg 3938
 gtttgttggc ttcggctagt ttgtgttcttccgcgttgcgat gatgttgtca acttcgtgtt 3998
 gggagaggcgtc gttttcactg atgcgtcgaa tggtaactcgtt gttgggtgttgc agttgggttg 4058
 agaggttagtgc ggggttctggg atttcggcgat gttgggtgttgc gttgggtgttgc 4118
 ggcctgggttgc gttgggttgc ctggggaggt cgtatgtatcc gtttgagtct ccggcgttgtt 4178
 tgaagtgaat taggcgttgg tagccgtatt cctgggttggg gaggtacgac agaatgagga 4238
 agtttgtgc ttctcctgcgat gttgggttgc gttgggttgc gttgggttgc 4298
 cggggagaat gttttttgg gtcatggctt ctctttgtt tgctctgtaa gtcgttatgt 4358
 gggcatggga aagccccggc aaccctttgg gtcaaccggg gctagatagt cgcttagaat 4418
 ggcttctagg ctgcgtctcg ggggtgtggc 4447

[0064]

<210> 8

<211> 427

<212> PRT

<213> *Brevibacterium lactofermentum*

<400> 8

Val Asn Thr Ser Lys Glu Pro Gln Val Asn Glu Gly Ser Lys Val Thr

1

5

10

15

Arg Ala Arg Ala Trp Arg Arg Gln Asn Val Met Tyr Lys Ile Thr Asn

20	25	30
Ser Lys Ala Leu Ala Gly Cys His Arg Trp Arg Arg Asp Glu Ala Val		
35	40	45
Ala Val Ser Trp Ser Ser Asn Gly Ala Ser Gln Phe Glu Gly Leu Gln		
50	55	60
Asn Ser His Ser Arg Trp Gly Ser Ser Leu Ala Glu Leu Glu Val Met		
65	70	75
Gly Glu Arg Arg Ile Glu Leu Ala Ile Ala Thr Lys Asn His Leu Ala		
85	90	95
Ala Gly Gly Ala Leu Met Met Phe Val Gly Thr Val Arg His Asn Arg		
100	105	110
Ser Gln Ser Phe Ala Gln Val Glu Ala Gly Ile Lys Thr Ala Tyr Ser		
115	120	125
Ser Met Val Lys Thr Ser Gln Trp Lys Lys Glu Arg Ala Arg Tyr Gly		
130	135	140
Val Glu His Thr Tyr Ser Asp Tyr Glu Val Thr Asp Ser Trp Ala Asn		
145	150	155
Gly Trp His Leu His Arg Asn Met Leu Leu Phe Leu Asp Arg Pro Leu		
165	170	175
Ser Asp Asp Glu Leu Lys Ala Phe Glu Asp Ser Met Phe Ser Arg Trp		
180	185	190
Ser Ala Gly Val Val Lys Ala Gly Met Asp Ala Pro Leu Arg Glu His		
195	200	205
Gly Val Lys Leu Asp Gln Val Ser Thr Trp Gly Gly Asp Ala Ala Lys		
210	215	220
Met Ala Thr Tyr Leu Ala Lys Gly Met Ser Gln Glu Leu Thr Gly Ser		
225	230	235
Ala Thr Lys Thr Ala Ser Lys Gly Ser Tyr Thr Pro Phe Gln Met Leu		
245	250	255

Asp Met Leu Ala Asp Gln Ser Asp Ala Gly Glu Asp Met Asp Ala Val
 260 265 270
 Leu Val Ala Arg Trp Arg Glu Tyr Glu Val Gly Ser Lys Asn Leu Arg
 275 280 285
 Ser Ser Trp Ser Arg Gly Ala Lys Arg Ala Leu Gly Ile Asp Tyr Ile
 290 295 300
 Asp Ala Asp Val Arg Arg Glu Met Glu Glu Leu Tyr Lys Leu Ala
 305 310 315 320
 Gly Leu Glu Ala Pro Glu Arg Val Glu Ser Thr Arg Val Ala Val Ala
 325 330 335
 Leu Val Lys Pro Asp Asp Trp Lys Leu Ile Gln Ser Asp Phe Ala Val
 340 345 350
 Arg Gln Tyr Val Leu Asp Cys Val Asp Lys Ala Lys Asp Val Ala Ala
 355 360 365
 Ala Gln Arg Val Ala Asn Glu Val Leu Ala Ser Leu Gly Val Asp Ser
 370 375 380
 Thr Pro Cys Met Ile Val Met Asp Asp Val Asp Leu Asp Ala Val Leu
 385 390 395 400
 Pro Thr His Gly Asp Ala Thr Lys Arg Asp Leu Asn Ala Ala Val Phe
 405 410 415
 Ala Gly Asn Glu Gln Thr Ile Leu Arg Thr His
 420 425

【0065】

<210> 9
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
introducing mutation to pAM330

<400> 9

aaaccgggc tacgtctgat gctttgaatc 30

[0066]

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
introducing mutation to pAM330

<400> 10

tttgtgcattt aaacaagatg tag 23

[0067]

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
introducing mutation to pAM330

<400> 11

ttttcccgagg agcttgccac accccgag 28

【0068】

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
introducing mutation to pAM330

<400> 12

tgcctacat cttgttgat gcaccaa

27

【0069】

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
introducing mutation to pAM330

<400> 13

gaggtttca ccgttctgca tgcc

24

【0070】

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
introducing mutation to pAM330

<400> 14

aactcaccgc cctgcaattc aac

23

【0071】

<210> 15

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for PCR

<400> 15

gccttaccgcg gcaaagaagt ggcag

25

【0072】

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for PCR

<400> 16

gccttgaact agggcgctt taagt

25

【0073】

<210> 17
 <211> 4235
 <212> DNA
 <213> *Brevibacterium flavum*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1852)..(2364)

<400> 17

```

aaacccgggt tttcttctgc aactcgggcg ccgaagcaaa cgaggctgct ttcaagattg 60
cacgcttgcac tggtcgttcc cggattctgg ctgcagttca tggtttccac ggcgcacca 120
tggttccct cgcgttgact ggccagccag acaagcgtga agcgttccctg ccaatgccaa 180
gcggtgtgga gtttaccct tacggcgaca ccgattactt gcgcggaaatg gttagaaacca 240
acccaacgga tgtggctgct atcttcctcg agccaatcca gggtaaaacg ggcgttggc 300
cagcacctga aggattccctc aaggcagtgc gcgagctgtg cgatgagttac ggcatttgc 360
tgcacccga tgaagtccag actggcgttg gccgtaccgg cgatttcttt gcacatcagc 420
acgatggcgt tggccctgat gtggtgacca tggcaaggg acttggcggc ggtttccca 480
tcggtgctt tttggccact ggccgtgcag ctgaattgat gaccccaggc aagcacggca 540
ccactttcgg tggcaaccca gttgttgat cagctgccaa ggcagtgtg tctgttgcg 600
atgacgcctt ctgcgcagaa gttacccgca agggcgagct gttcaaggta cttttgcac 660
agttgacgg cttttagac gtccgtggca gggcttgat gttggcgtg gtgcgtggagc 720
gcgcgtgcg aaagcaagct gttttgatg gtttaagca cggcgttatt ttgaatgcac 780
cggcggacaa cattatccgt ttgacccgc cgtggatgat caccgacgaa gaaatgcac 840
acgcagtcaa ggctattgcc gagacaatcg cataaaggac taaaacttat gacttcacaa 900
ccacaggttgc cccatttccct ggctgtatgat gatctcaccc ctgcagagca ggcagagg 960
ttgacccttag cggcaagct caaggcagcg ccgtttcgg agcgtccact cgagggacca 1020
aagtccgtt cagttttt tgataagact tcaactcgta ctcgttctc cttcgacgcg 1080

```

ggcatcgctc atttgggtgg acatgccatc gtcgtggatt ccggcagctc acagatgggt 1140
 aaggcgaga ccctcgagga caccgcagct gtattgtccc gctacgtgga agcaattgtg 1200
 tggcgcacct acgcacacag caattccac gccatggcgg agacgtccac tgtgccgctg 1260
 gtgaactcct tgtccgatga tctgcaccca tgccagattc tggctgatct gcagaccatc 1320
 gtggaaaacc tcagccctga agaaggccca gcaggccta agggtaagaa ggctgtgtac 1380
 ctggcgatg gcgacaacaa catggccaac tcctacatga ttggcttgc caccgcggc 1440
 atggatattt ccatcatcgc tcctgaaggg ttccagcctc gtgcggatt cgtggagcgc 1500
 gcggaaaagc gtggccagga aaccggcgcg aaggttgttgc acccgacag cctcgacgag 1560
 gttgccggcg ccgatgttgt catcaccat acctgggtat ccatgggtat ggaaaacgac 1620
 ggcatcgatc gcaccacacc ttctgttcct taccaggta acgttaggtt catggcgaaa 1680
 gctaacgacg ggcgcacatctt cctgcactgc cttcctgcct accgcggcaa agaagtggca 1740
 gcctccgtga ttgtatggacc agcgtccaaa gtttcgtat aagcagaaaa cccctccac 1800
 gctcagaaag cactgttgtt gtggctgctg gccaaccagc cgaggtaaga c atg tct 1857

Met Ser

1

ctt ggc tca acc ccg tca aca ccg gaa aac tta aat ccc gtg act cgc 1905
 Leu Gly Ser Thr Pro Ser Thr Pro Glu Asn Leu Asn Pro Val Thr Arg

5	10	15
---	----	----

act gca cgc caa gct ctc att ttg cag att ttg gac aaa caa aaa gtc 1953
 Thr Ala Arg Gln Ala Leu Ile Leu Gln Ile Leu Asp Lys Gln Lys Val

20	25	30
----	----	----

acc agc cag gta caa ctg tct gaa ttg ctg ctg gat gaa ggc atc gat 2001
 Thr Ser Gln Val Gln Leu Ser Glu Leu Leu Asp Glu Gly Ile Asp

35	40	45	50
----	----	----	----

atc acc cag gcc acc ttg tcc cgg gat ctc gat gaa ctc ggt gca cgc 2049
 Ile Thr Gln Ala Thr Leu Ser Arg Asp Leu Asp Glu Leu Gly Ala Arg

55	60	65
----	----	----

aag gtt cgc ccc gat ggg gga cgc gcc tac tac gcg gtc ggc cca gta 2097
 Lys Val Arg Pro Asp Gly Gly Arg Ala Tyr Tyr Ala Val Gly Pro Val

70	75	80		
gat agc atc gcc cgc gaa gat ctc cgg ggt ccg tcg gag aag ctg cgc			2145	
Asp Ser Ile Ala Arg Glu Asp Leu Arg Gly Pro Ser Glu Lys Leu Arg				
85	90	95		
cgc atg ctt gat gaa ctg ctg gtt tct aca gat cat tcc ggc aac atc			2193	
Arg Met Leu Asp Glu Leu Leu Val Ser Thr Asp His Ser Gly Asn Ile				
100	105	110		
gcg atg ctg cgc acc ccg ccg gga gct gcc cag tac ctg gca agt ttc			2241	
Ala Met Leu Arg Thr Pro Pro Gly Ala Ala Gln Tyr Leu Ala Ser Phe				
115	120	125	130	
atc gat agg gtg ggg ctg aaa gaa gtc gtt ggc acc atc gct ggc gat			2289	
Ile Asp Arg Val Gly Leu Lys Glu Val Val Gly Thr Ile Ala Gly Asp				
135	140	145		
gac acc gtt ttt gtt ctc gcc cgt gat ccg ctc aca ggt aaa gaa cta			2337	
Asp Thr Val Phe Val Leu Ala Arg Asp Pro Leu Thr Gly Lys Glu Leu				
150	155	160		
ggt gaa tta ctc agc ggg cgc acc act taaagcgccc cttagttcaag				2384
Gly Glu Leu Leu Ser Gly Arg Thr Thr				
165	170			
gcttgtaat cgcttgtaa tgcaggcagg taaggtataa cccgagtgtt tttcgagga				2444
ataccaaccc ttcaacaça ataatttct ttaaacatcc ttgctgtcca ccacggctgg				2504
caaggaactt aaaatgaagg agcacaccc tc atgactaacc gc atcg ttct tgcatactcc				2564
ggcggctctgg acaccactgt ggcaattcca tacctgaaga agatgattga tggtaagtc				2624
atcg cagtt ctctcgacct gggccaggg tggagagaaca tggacaacgt tcgccc agcgt				2684
gcattggatg ccgggtgcagc tgagtccatc gtttgtatg caaaggatga gttcgctgag				2744
gagtactgcc tgccaaaccat caaggcaa ac ggc atgtaca tgaagc agt cccactggtt				2804
tctgcaatct cccgccccact gatcgtaag cacctcggtt aggctggcaa gc agttcaac				2864
ggtacccacg ttgcacacgg ctgcactggt aagggcaacg accaggttcg tttcgaggc				2924
ggcttcatgg acaccgatcc aaacctggag atcattgcac ctgctcgtga cttcgcatgg				2984

acccgcgaca aggctatcgc cttcgccgag gagaacaacg ttccaatcga gcagtccgtg 3044
 aagtccccat tctccatcga ccagaacgtc tggggccgctg ctattgagac cggttacctg 3104
 gaagatctgt ggaatgctcc aaccaaggac atctacgcat acaccgagga tccagctctg 3164
 ggtaacgctc cagatgaggt catcatctcc ttcgagggtg gcaagccagt ctccatcgat 3224
 ggccgtccag tctccgtact gcaggctatt gaagagctga accgtcgtgc aggccgcacag 3284
 ggcgttggcc gccttgacat gttttaggac cgtctcgtgg gcatcaagtc ccgcgaaatc 3344
 tacgaagcac caggcgcaat cgcaactgatt aaggctcacf aggcttgga agatgtcacc 3404
 atcgagcgcg aactggctcg ctacaagcgt ggcgttgacg cacgttggc tgaggaagta 3464
 tacgacggcc tgggttcgg acctctgaag cgctccctgg acgcgttcat tgattccacc 3524
 caggagcacg tcacccggcga tatccgcatg gttctgcacg caggttccat caccatcaat 3584
 ggtcgtcggtt ccagccactc cctgtacgac ttcaacctgg ctacctacga caccggcgac 3644
 accttcgacc agaccctggc taaggcttt gtccagctgc acggctgtc ctccaagatc 3704
 gctaacaagc gcgatcgcga agctggcaac aactaagcca cctttcaag catccagact 3764
 agaacttcaa gtatttagaa agtagaagaa caccacatgg aacagcacgg aaccaatgaa 3824
 ggtgcgttgtt gggcgcccg cttctccgtt ggaccctccg aggccatgtt cgccttgagt 3884
 gtctccactc atttcgactg gttttggcc ctttatgtat tggtggcctc caaggcacac 3944
 gccaagggtt tgcaccaagc agagctactt tctgatgaag atctagccac catgctggct 4004
 ggtcttgatc agctggcaaa ggtatgtcgcc gacggAACCT tcggccgct gccttctgtat 4064
 gaggtgtgc acggcgcgat ggaacgcggcgtt ctgattgacc gcgttggtcc tgaggtggc 4124
 ggcgtctgc ggcgttggcgtt ttcccgcaac gaccagggtgg caaccctgtt ccgcattgtgg 4184
 gtccgcgacg cagtgcgcga catgcgcgtg ggaacaacgg agcttgcga c 4235

[0074]

<210> 18

<211> 171

<212> PRT

<213> *Brevibacterium flavum*

<400> 18

Met Ser Leu Gly Ser Thr Pro Ser Thr Pro Glu Asn Leu Asn Pro Val

1	5	10	15
Thr Arg Thr Ala Arg Gln Ala Leu Ile Leu Gln Ile Leu Asp Lys Gln			
20	25	30	
Lys Val Thr Ser Gln Val Gln Leu Ser Glu Leu Leu Leu Asp Glu Gly			
35	40	45	
Ile Asp Ile Thr Gln Ala Thr Leu Ser Arg Asp Leu Asp Glu Leu Gly			
50	55	60	
Ala Arg Lys Val Arg Pro Asp Gly Gly Arg Ala Tyr Tyr Ala Val Gly			
65	70	75	80
Pro Val Asp Ser Ile Ala Arg Glu Asp Leu Arg Gly Pro Ser Glu Lys			
85	90	95	
Leu Arg Arg Met Leu Asp Glu Leu Leu Val Ser Thr Asp His Ser Gly			
100	105	110	
Asn Ile Ala Met Leu Arg Thr Pro Pro Gly Ala Ala Gln Tyr Leu Ala			
115	120	125	
Ser Phe Ile Asp Arg Val Gly Leu Lys Glu Val Val Gly Thr Ile Ala			
130	135	140	
Gly Asp Asp Thr Val Phe Val Leu Ala Arg Asp Pro Leu Thr Gly Lys			
145	150	155	160
Glu Leu Gly Glu Leu Leu Ser Gly Arg Thr Thr			
165	170		

【0075】

<210> 19

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for PCR

<400> 19

cccggtttt cttctgcaac tcggg

25

[0076]

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for PCR

<400> 20

gtcgacaagg tcgggttgttc ccagc

25

[0077]

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for PCR

<400> 21

ccccctagttt aaggcttgaaatc

24

[0078]

<210> 22

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for PCR

<400> 22

gtcttacctc ggctgggtgg ccagc

25

【図面の簡単な説明】

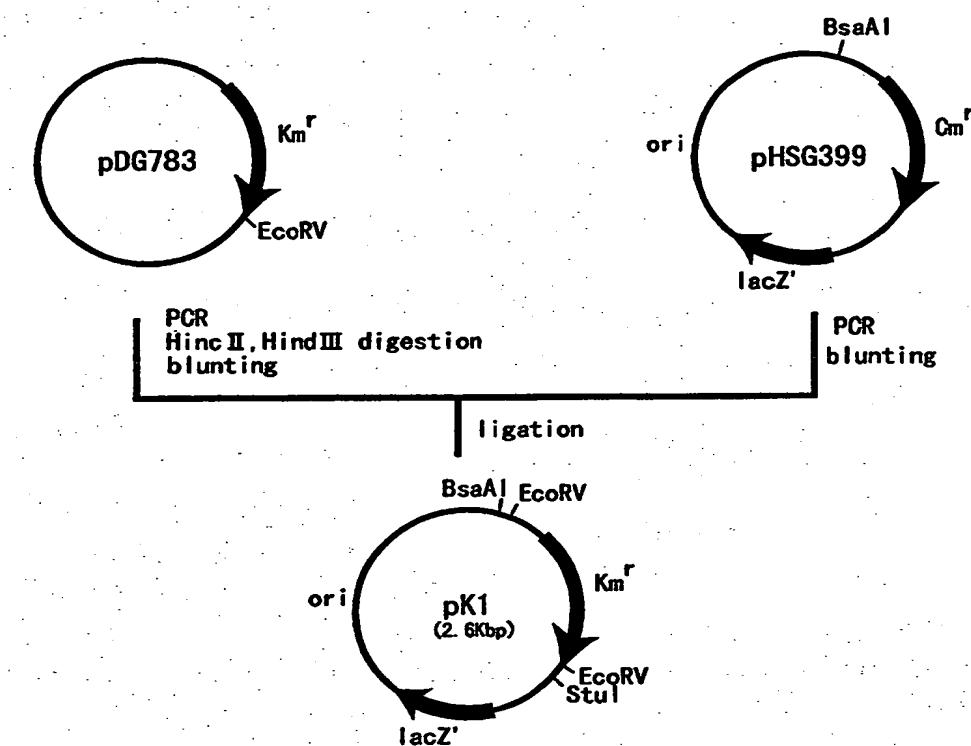
【図1】プラスミドpK1の構築過程を示す図。

【図2】プラスミドpSFK6の構築過程を示す図。

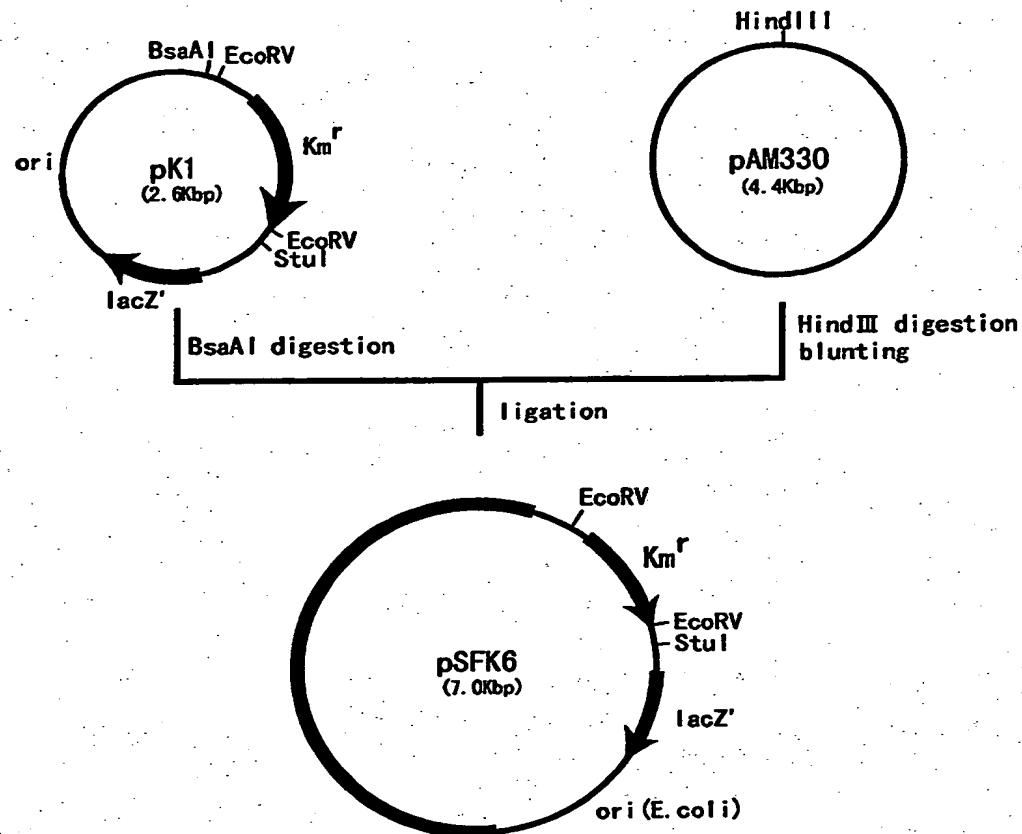
【図3】プラスミドpSFKT1の構築過程を示す図。

【書類名】 図面

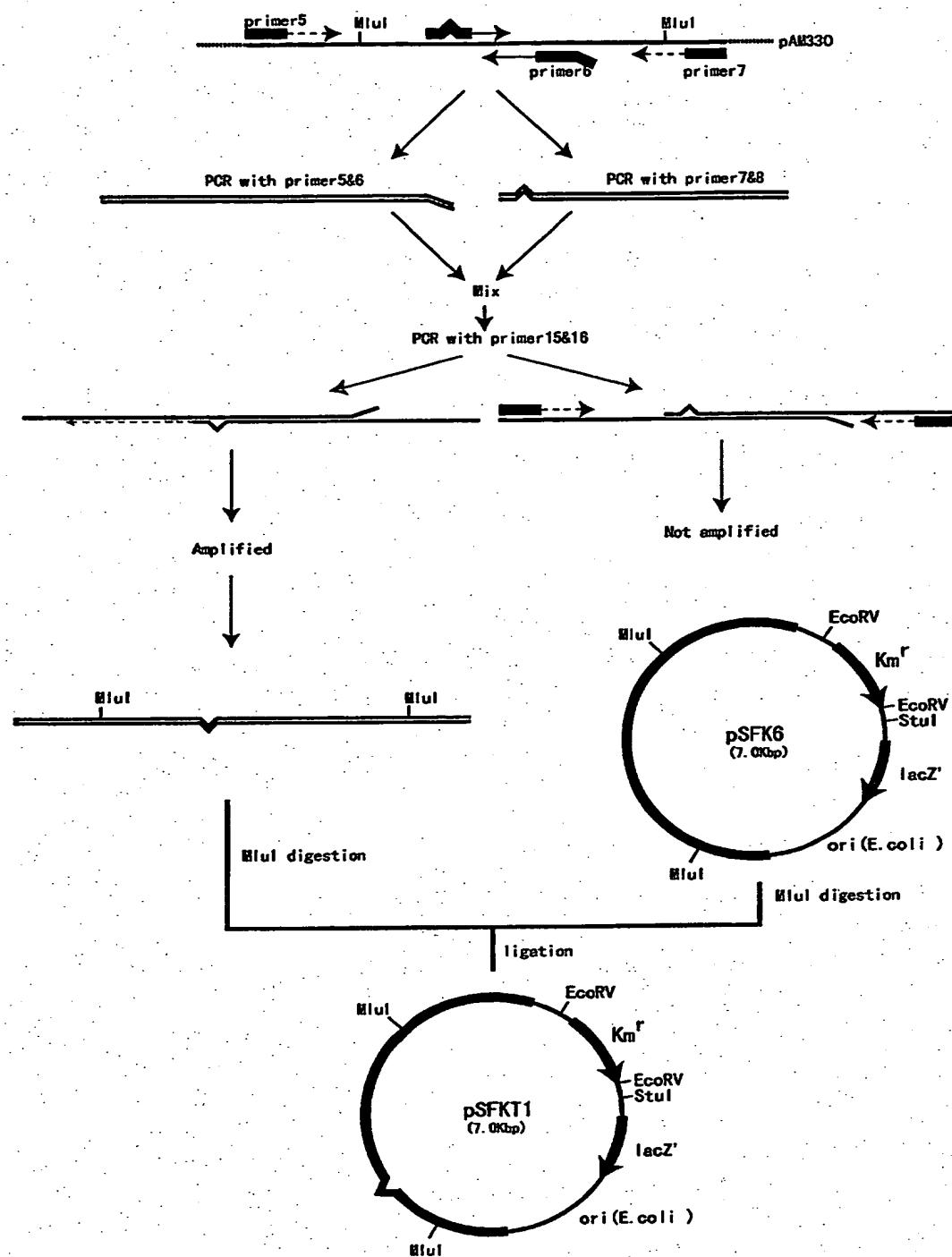
【図1】



【図2】



【図3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 コリネ型細菌のL-アルギニン生合成のリプレッサーを特定し、コリネ型細菌のL-アルギニン生産能を向上させること。

【解決手段】 L-アルギニン生合成のリプレッサーを、同リプレッサーをコードする遺伝子を破壊することにより欠失し、かつ、L-アルギニン生産能を有するコリネ型細菌を培地で培養し、培地中にL-アルギニンを生成蓄積せしめ、これを該培地から採取することにより、L-アルギニンを製造する。

【選択図】 図2

出願人履歴情報

識別番号 [000000066]

1. 変更年月日 1991年 7月 2日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都中央区京橋1丁目15番1号

氏 名 味の素株式会社